

**Жаворонок С. В.**

*Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск*

**Воропаева А. В.**

*Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека,  
г. Гомель, Беларусь*

**Воропаев Е. В.**

*Гомельский государственный медицинский университет,  
Беларусь*

**Баранов О. Ю.**

*Гомельский государственный медицинский университет,  
Беларусь*

## **РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО–БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ HELICOBACTER PYLORI К КЛАРИТРОМИЦИНУ**

Развитие устойчивости к кларитромицину во время терапии — преобладающая причина неуспешного лечения, обусловлена возникновением точечных мутаций в V функциональном домене 23S рРНК-гена *Helicobacter pylori*. В настоящее время описано более 20 точечных мутаций, обуславливающих резистентность к кларитромицину.

**Цель:** определить точечные мутации в 23s rRNA-гене *H. pylori*, ответственные за резистентность к кларитромицину, разработать методику выявления точечных мутаций и определить распространенность устойчивости к кларитромицину в бактериальной популяции *H. pylori*, циркулирующей на территории Республики Беларусь.

По результатам клинического обследования пациентов (n = 132) выявлено 9 пациентов с неуспешной эрадикационной терапией, основанной на применении кларитромицина. Используя препараты ДНК данных пациентов, полученные из биоптатов слизистой оболочки желудка (СОЖ), проводили секвенирование участка 23S рРНК-гена *H. pylori* размером 783 н.п. (нуклеотидные позиции по референс образцу U27270 GenBank NCBI 2028-2812) для выявления ассоциированных с резистентностью нуклеотидных замен.

Анализ результатов секвенирования образцов ДНК, полученных от пациентов с неуспешной эрадикационной терапией *H. pylori*, основанной на применении кларитромицина, показал наличие основных точечных мутаций A2143G, A2142G и T2182C, ответственных за резистентность к кларитромицину в белорусской популяции.

Оптимизация методики (подбор способа выделения ДНК из биоптатов СОЖ, реакционной смеси и температурного режима) позволили выявлять точечные мутации A2142G/C и A2143G более экономичным по сравнению с секвенированием ДНК методом, в основе которого лежит анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПЦР–ПДФ), с использованием эндонуклеаз ре-

стрикции *MboII*, *HhaI* и *Eco 3II* (*BsaI*). Для выявления точечной мутации T2182C была построена структура праймера, создающего сайт рестрикции для эндонуклеазы *MspI* (CCGG) в случае наличия мутации — С в 2182 позиции и подобран режим амплификации с использованием двухстадийной ПЦР. Затем провели определение аналитических и диагностических характеристик с использованием приготовленных стандартов, полученных из бактериальной суспензии *H. pylori* и технологии ПЦР в реальном времени (протокол SybrGreen). Параллельно во всех исследуемых образцах анализировали выявление гена  $\beta$ -актина человека, используемого в качестве внутреннего контроля. Верификацию разработанной методики проводили с использованием фрагментного ДНК анализа, что позволило дополнительно проводить количественную оценку образцов в случаях присутствия мутантных и нормальных генотипов одновременно. Полученные высокие аналитические и диагностические характеристики разработанной методики позволили определить популяционный уровень первичной резистентности *H. pylori* к кларитромицину, который составил 5,2 % (13 из 251 исследуемых образцов).

**Выводы.** Таким образом, применение молекулярно-биологических методов позволяет проводить своевременное выявление устойчивых штаммов и обоснованное назначение эрадикационной терапии в современных условиях развития биологического разнообразия популяций микроорганизмов, связанных с широким и не всегда клинически обоснованным применением антибиотикотерапии.